

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-072564

(43)Date of publication of application : 06.03.1992

(51)Int.Cl.

G01N 33/543  
G01N 33/531

(21)Application number : 02-185844

(71)Applicant : MITSUBISHI KASEI CORP

(22)Date of filing : 13.07.1990

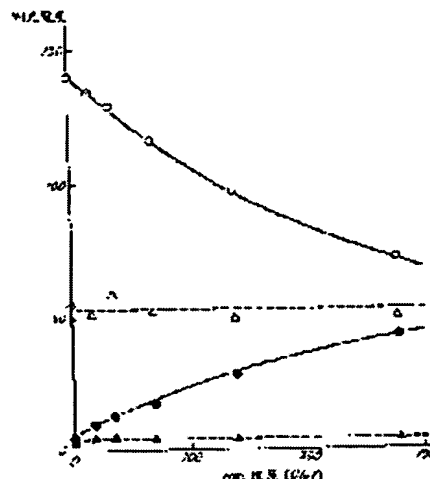
(72)Inventor : MUNEBAYASHI TAKAAKI  
NAMITA CHIEKO  
JINNO HIDEKI

## (54) METHOD FOR MEASURING IMMUNITY

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To detect a non-singular reaction by making first and second pigment labelling particles both react with a sample liquid containing an antigen or antibody to be measured, and measuring changes in the respective signals of the first and second pigment labelling particles caused by an antigen-antibody reaction and a non-singular reaction, respectively.

**CONSTITUTION:** A first labelling pigment which emits fluorescence or phosphorescence and an antigen or antibody of the same kind as or corresponding to an antigen or antibody to be measured are carried on first labelling carrier particles. A second pigment which is different in emission wavelength, excitation wavelength or emission life from the first pigment and a material which does not contain a part that is singularly bonded to the antigen or antibody to be measured are carried on second labelling carrier particles. The first and second labelling carrier particles are made to react with the antigen or antibody to be measured and changes in the respective signals of the first and second pigment labelling particles caused by respective singular and non-singular immunoreactions are measured from the intensity of the fluorescence.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(6)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-72564

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

G 01 N 33/543  
33/531

識別記号

D  
B

庁内整理番号

7906-2 J  
7906-2 J

⑬ 公開 平成4年(1992)3月6日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 免疫測定法

⑮ 特 願 平2-185844

⑯ 出 願 平2(1990)7月13日

⑰ 発 明 者 宗 林 孝 明 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社  
総合研究所内  
⑰ 発 明 者 波 多 千 恵 子 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社  
総合研究所内  
⑰ 発 明 者 神 野 英 毅 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社  
総合研究所内  
⑰ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号  
⑰ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

免疫測定法

2. 特許請求の範囲

- (1) (a) (i) 蛍光またはリン光を発する第一の色素および(ii)抗体または抗原を不溶性担体粒子に担持してなる第一の色素標識粒子と  
(b) (i) 前記第一の色素とは発光波長、励起波長または発光寿命の異なる、蛍光またはリン光を発する第二の色素および(ii)第一の粒子に担持された抗体または抗原が試料中の抗原または抗体と特異的に結合する部位を含まない物質を不溶性担体粒子に担持してなる第二の色素標識粒子とを  
(c) 被測定抗原または抗体を含む試料液と反応させ、抗原抗体反応に伴う第一の色素標識粒子によるシグナルの変化および非特異反応に伴う第二の色素標識粒子によるシグナルの変化を測定することによっ

て、抗原抗体反応中の非特異反応を検出することを特徴とする免疫測定法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は不溶性担体粒子を用いる発光免疫測定法に関する。

[従来の技術]

従来、抗原抗体反応を利用した免疫測定法が種々の疾病の早期検出法や、極微量の物質の検出法として知られている。高感度な免疫測定法には種々の方法があり、抗体又は抗原に標識物質として放射性同位体(RI)、酵素、蛍光物質、発光物質などを結合して用いるラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、蛍光イムノアッセイ(FIA)、発光イムノアッセイ(LIA)などに分類される。また、ラテックス等の不溶性担体粒子に担持された抗体または抗原と、それに対応する抗原または抗体とを反応させその反応に伴う反応混合物の透過光の変化から抗原抗体反応の速度を測定する方法(LPIA)が知られている。

## [発明が解決しようとする問題点]

しかし、かかる従来技術においては種々の問題を持つ。たとえば、RIAはRIの取り扱いおよび廃棄に対する制約がある。LPIAは簡便性、操作性などに優れた方法ではあるが、検出感度の改良が望まれている。EIA、FIAなどは取り扱いの安全性については有利であるが、検出感度はRIAに若干劣る。また、EIAは酵素反応を伴うため取扱いもFIAほど簡便ではない。

FIAにおける検出感度の改良法として、特開昭59-122950号公報には蛍光性微粒子を用いた免疫測定法が述べられている。即ち、通常FIAで用いられる標識抗原または標識抗体のかわりに蛍光物質を含有させたコロイド粒子に抗原または抗体を担持させることにより、蛍光物質の数を増やすことができるため、高感度な検出が期待される。

しかしながら、赤血球凝集反応をはじめとして、ラテックス凝集反応、ゼラチン凝集反応などのいわゆる粒子凝集反応では非特異的な凝集を伴う非特異反応が特に多く見られることが知られて

ド因子と反応するFc部分をペプシン酵素処理して除去することにより非特異反応を低減させている。また、 $F(ab')_2$ と反応する検体も少数存在するので、この場合は反応系に免疫していないウサギから調製した $F(ab')_2$ を加え、ラテックス試薬の $F(ab')_2$ と反応する前に吸収することで対処している。(Mitsubishi Kasei R & D Review, 2,105 (1988))

あるいは、酢酸緩衝液などで検体を前処理することにより、必要でない蛋白質を除くことで、非特異反応を除く方法もある。

上記の方法で非特異反応の出現はかなり低減できるものの、まだ非特異反応を完全に抑えることは不可能であるし、粒子自体に起因する吸着は避けられない。また、非特異反応を測定する方法も開発されているわけではない。そこで、RIAやEIAなど非特異反応が比較的少ないといわれる方法で得た測定値と比べて値が解離するものを非特異反応と呼んでいるが現状である。

従って、前記特開昭59-122950号公報などの蛍

光性微粒子を用いる免疫測定法を高感度検出法として実用化するためには、これら非特異反応を抑制する方法または検出する手段を開発、併用することが重要な要件となる。

## [課題を解決するための手段]

本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意検討した結果、不溶性担体粒子を標識することにより高感度化しながら、かつ粒子の非特異的反応を検出できる新しい発光免疫測定法を開発した。

即ち、本発明の要旨は、

- (1) (a) (i) 蛍光またはリン光を発する第一の色素および(ii) 抗体または抗原を不溶性担体粒子に担持してなる第一の色素標識粒子と
- (b) (i) 前記第一の色素とは発光波長、励起波長または発光寿命の異なる、蛍光またはリン光を発する第二の色素および(ii) 第一の粒子に担持された抗体または抗原が試料中の抗原または抗体と特異的に結合する部位を含まない物質を不溶性担体粒子に担持してなる第二の色素標識粒子とを

- (c) 被測定抗原または抗体を含む試料液と反応させ、抗原抗体反応に伴う第一の色素標識粒子によるシグナルの変化および非特異反応に伴う第二の標識粒子によるシグナル変化を測定することによって、抗原抗体反応中の非特異反応を検出することを特徴とする免疫測定法

に存する。

以下、本発明を詳細に説明をする。

本発明で用いる標識色素は、蛍光またはリン光を発する色素である。本発明では2種の色素をそれぞれ不溶性担体粒子に担持させ、第一の色素粒子を免疫測定用に、第二の色素標識粒子を非特異反応または吸着の検出用に用いるため、第一、第二の色素は共存する系で独立に測定できることが必要である。従って、本発明で用いる第一、第二の色素に求められる条件としては、たとえば、

- 1) 発光のピーク波長が互いに離れていること。
- 2) 励起光の波長が互いに離れていること。

2)の場合も多く発光性色素で、励起光の異なるものが知られているが、通常、励起光も発光と同様に幅広いスペクトルを示すので励起の最大値から多少離れていても発光を観測することが可能なものが多い。従って、実際には、1)と2)の組み合わせ、つまり、発光のピーク波長が互いに離れていて、かつ、励起光の波長も互いに離れている色素の組み合わせによって、より正確な測定を行うことができる。これらの組み合わせとしては、EuとTbの組み合わせ等が挙げられる。

3)の例としては、フルオレセインやローダミンなどの通常の蛍光色素(寿命数-数10nsec)と希土類キレート化合物(寿命 数10μsec-数 msec)の組み合わせや、上記フルオレセインやローダミン等の通常の短寿命の蛍光色素とエオシンなどのリン光色素の組み合わせ、Euキレート化合物(寿命 数100μsec)とTbキレート化合物(寿命 数10μsec-数 msec)の組み合わせなど考えられる。

色素標識をおこなう不溶性担体粒子としては反応させる時に用いる液体媒体に実質的に不溶性で

- 3) 発光の寿命が互いに離れていること。

などが挙げられる。

1)の例としては、たとえば希土類キレート化合物で元素としてユーロピウム(Eu)とサマリウム(Sm)を用いると2種の抗原または抗体を同時に測定できることがClinical Chemistry, 33, 48(1987)に示唆されているが、Eu(発光極大 615nm)とテルビウム(Tb)(発光極大 545nm)の組み合わせの方が発光のピーク波長より離れている(約 70nm)。希土類キレート化合物は発光スペクトルがシャープなため分離計測には適しているが、バックグラウンドや互いの色素の共存の影響を補正するなどして測定できる組み合わせであれば、他の蛍光、リン光性色素でも問題はない。通常、フルオレセインイソチオシアネート(発光極大 520nm)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(発光極大 570nm)、フィコビリプロテイン(フィコシアニン:発光極大 650nm、フィコエリスリン:発光極大 580nm)などの蛍光色素の組み合わせが使用できることが多い。

0.01-10 μm、好ましくは0.05-3 μmの平均粒径を有するものが用いられる。

担体粒子の材質は、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体のような乳化重合により得られる有機高分子のラテックス、あるいはシリカ、シリカ-アルミナのあような無機酸化物、リボソームのような脂質重合体、赤血球のような生体成分、ゼラチン、あるいは金コロイドのような金属コロイド粒子等が用いられる。

不溶性担体粒子への標識色素の担持方法には、化学的に結合させる方法、粒子を重合して作成する際に色素を加えて粒子内部に閉じ込める方法、あらかじめ、タンパク質やペプチドなどと色素を結合させておいてからそのタンパク質、ペプチドを粒子に担持する方法がある。たとえば、特開昭54-101439号公報には、希土類キレートをTOPO(トリ-n-オクチルホスフィンオキシド)との協同抽出法を利用して有機高分子のラテックスの内部に閉じ込める方法が述べられている。これに従って作成した標識粒子は標識強度、安定性共に良好で

あった。

本発明の第一の標識担体粒子は、上記の第一の標識色素と被測定抗原または抗体と同種または相対する抗原または抗体を担持している。第二の標識担体粒子には第一の色素とは共存下で測定できる第二の色素と被測定抗原または抗体とは特異的に結合する部位を含まない物質を担持している。

不溶性担体粒子に抗原または抗体あるいは被測定抗原または抗体とは特異性に結合する部位を含まない物質担持させる(感作する)方法は、既に多くの方法が提案されている。例えば、担体に対し感作したい物質を物理的に吸着させる方法、カップリング剤により化学的に変性させた後に化学結合させる方法、また、スペーサー分子をはさんで結合させることもよく知られている。抗体を感作した上に抗原を結合させて抗原感作粒子とすることもできる。また重合による粒子作成時に抗原を混入して粒子内に取り込む方法、他のタンパク質に化学結合法を用いて結合させた後でそのタンパク質を物理的または化学的に感作する方法などがあ

る。標識エピトープの異なる2種以上のモノクローナル抗体を組み合わせて使用すれば適用できる。

一方、抗原としてはたとえばタンパク質、ポリペプチド、ステロイド、多糖類、脂質、花粉、遺伝子工学的に産生された組換え蛋白質、薬物等種々のものが挙げられる。

第二の標識粒子に感作されるものには、被測定抗原または抗体と特異的に反応する部位を含まない免疫グロブリン画分、それらの誘導体または他の蛋白質、または担体粒子の安定化のために粒子表面を覆う界面活性剤やポリマーなどがある。たとえば、第一の標識粒子に、被測定抗原をウサギに免疫して得た抗血清から精製した $F(ab')_2$ を感作する場合は、第二の標識粒子には、免疫していないウサギから精製した $F(ab')_2$ を感作することが望ましい。あるいは、第一の標識粒子に、遺伝子組み換え技術を用いて製造した抗原を感作する場合は第二の標識粒子には、培養液中に存在する他の蛋白質を感作すると、抗原中に存在する不純物に由来する非特異反応を検出することが可能とな

る。

不溶性担体粒子に抗原または抗体あるいは被測定抗原または抗体とは特異的に反応する部位を含まない物質を感作するのと同様に、固相に抗原、抗体を担持させる方法もそれぞれの固相にあわせて、種々の方法が応用されている。この場合も物理吸着による方法と化学結合による方法がある。

抗体としては、通常IgGが用いられているが、ペプシン、パバインなどの消化酵素あるいはジチオスレイトール、メルカプトエタノールなどの還元剤を用いて、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'などに低分子化したものを用いても良い。また、IgGだけでなくIgMあるいはこれをIgGと同様の処理により低分子化したフラグメントを用いても良い。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも適用できる。

モノクローナル抗体の適用については、B型肝炎ウイルス表面抗原のように、繰り返し構造を持つタンパク質に対してはモノクローナル抗体は1種以上で使用できる。また繰り返し構造がなくても認

る。

不溶性担体粒子に、標識色素と感作したい物質を担持する順序には特に制限はないが、標識色素を担持した後、感作したい物質を担体するのが好ましい。

第一の標識粒子と第二の標識粒子の使用量には特に制限はないが、一般に、反応液中で、0.0001-1重量%、好ましくは0.001-0.1重量%のものが用いられる。第一の標識粒子と第二の標識粒子の使用する比にも特に制限はないが、第二の粒子には、第一の粒子の非特異的反応を抑える働きも考えられるので、通常、第一の粒子と等量またはそれ以上を用いることが好ましい。使用量の比較は、第一と第二の担体粒子の粒径が異なる場合は、表面積で換算することが通常行われる。

特異的免疫反応に伴う第一の色素標識粒子によるシグナルの変化および非特異的免疫反応に伴う第二の色素標識粒子によるシグナルの変化を測定するには公知の方法を採用できる。例えば、反応チューブ、マイクロタイターウェル、ガラスビー

ズ、ラテックスやゼラチンなどの微粒子、磁性体を含有したポリスチレンやセルロースなどの微粒子、メンブレン、フィルターなどを固相として用い、サンドイッチ法、阻害法などにより、固相と被測定抗原または抗体を介して結合した各色素標識粒子を測定することによりシグナルの増加を計測する方法と、固相と結合しなかった、残りの各色素標識粒子を測定することによりシグナルの減少を計測する場合がある。

マイクロタイターウェルを固相としたときの、サンドイッチ法による抗原測定を操作例として以下に述べる。

被測定抗原に対する1次抗体を固定化しておいた固相(マイクロタイターウェル)に被測定抗原を含む標準液または試料液と反応緩衝液を加え、一定時間インキュベートする。洗浄した後、被測定抗原に対する2次抗体( $F(ab')_2$ )を感作した第一の色素標識粒子(例えばEuキレート化合物含有粒子)と、免疫していない動物から得た $F(ab')_2$ を感作した第二の色素標識粒子(例えば、Tbキレート化合物含有

粒子)を混合し、反応緩衝液で希釈した、抗原と反応した上記固相を加え、一定時間インキュベートする。この段階で、固相と結合しなかった、残りの各色素標識粒子(以下、上清とする)のシグナルを(第一の標識のシグナルは励起光345nmのときの616nmの蛍光強度から、第二の標識粒子のシグナルは励起光296nmのときの546nmの蛍光強度から)それぞれ得る。この場合、時間分解蛍光測定を行えば、さらに蛍光測定の特異性は向上する。被測定抗原を介しておこる固相と第一の標識粒子との特異的結合ならびに第一および第二の標識粒子との非特異的吸着により、上清中のシグナルの変化は蛍光強度の減少として測定される。

上清を除去した後、洗浄し、被測定抗原を介して固相に結合している第一及び第二の標識粒子の蛍光強度を上記の上清の場合と同様に測定する。被測定抗原を介した固相と第一の標識粒子との特異的結合ならびに第一および第二の標識粒子との非特異的吸着により、固相におけるシグナルの変化は蛍光強度の増加として測定される。

測定する時は、そのまま測定しても良いし、SDSやTween 20などの界面活性剤を用いて結合した標識粒子を固相から離して液中に浮遊させた状態で測定することもできる。

上清測定の場合、第一の標識粒子の蛍光強度の減少量が被測定抗原との特異的反応量と固相との非特異的反応量の和をあらわし、第二の標識粒子の蛍光強度の減少量が固相との非特異的反応量をあらわす。

固相結合量の測定の場合、第一の標識粒子の蛍光強度の増加量が被測定抗原との結合による特異的反応量と固相との非特異的反応量の和をあらわし、第二の標識粒子の蛍光強度の増加量が固相との非特異的反応量をあらわす。

シグナル変化の測定法としては、上記のように固相との結合したものを測定する代わりに、抗原抗体反応により凝集した色素標識粒子を濾過して未反応の粒子を分離して得られる凝集粒子のシグナル変化を測定してもよい。

固相に結合した標識粒子と、結合していない標

識粒子とを分離する際、通常は、上記のように洗浄を何度か繰り返すことが行われるが、磁性体を含有した固相の場合は磁力を用いれば、分離を比較的簡便に行うことができる。また、フィルター等で濾過することにより簡便に分離する方法も知られている。

磁性体を含有した固相を用いた場合の抗原測定を操作例として以下に述べる。

被測定抗原に対する1次抗体を固定化しておいた、磁性体を含有した固相(以下、Mg固相とする。)、第一の標識粒子および第二の標識粒子を混合懸濁後、被測定抗原を含む標準液または試料液と反応緩衝液を加え、一定時間インキュベートする。磁石を用いてMg固相及びMgを固相を含む反応凝集物を沈殿させ、上清サンプルと沈殿サンプルに分離する。

上清サンプルからは、固相と反応しなかった、残りの各色素標識粒子のシグナルが得られ、該シグナルの変化は蛍光強度の減少として測定される。

沈殿サンプルからは、固相と反応した各色素標識粒子のシグナルが得られ、該シグナルの変化は、蛍光強度の増加として測定される。

その他、特願平1-329093号公報には、長寿命の発光色素を担持した微粒子の免疫反応に従う凝集を発光偏光度の変化として検出する方法が述べられている。この方法に従えば、反応液を分離することなく簡便に測定することが可能である。

#### [実施例]

以下、実施例をもとにして、より詳細な説明を行うが、本発明はその要旨をこえない限り、実施例に測定されるものではない。

#### [実施例 1]

希土類キレート Eu-TTA テノイルトリフルオロアセトン化合物  $1 \times 10^{-4}$  モルと、TOPO (前述)  $2 \times 10^{-4}$  モルをアセトン 40g に溶解した後、粒径  $0.22 \mu\text{m}$  のポリスチレンラテックス (Dow 社) 3g を水 40ml に懸濁させたものを混合し、エバポレーターによりアセトンを除去することにより、ラテックス粒子に Eu キレート化合物を TOPO と協同

抽出し Eu 標識粒子を作製した。

同様に、希土類キレート化合物の Tb-PTA ビバロイルトリフルオロアセトン化合物  $5 \times 10^{-5}$  モルと、TOPO  $11 \times 10^{-4}$  モルを粒径  $0.497 \mu\text{m}$  のポリスチレンラテックス (Dow 社) 3g に含有させることにより Tb 標識粒子を作製した。

Eu 標識ラテックスにウサギ抗 HBs (B 型肝炎ウイルス表面) 抗原  $F(ab')_2$  を感作した後、BSA で処理することにより粒子を安定化させた。

Tb 標識ラテックスに正常ウサギ  $F(ab')_2$  を感作した後、BSA で処理することにより粒子を安定化させた。

平均粒径  $1.5 \mu\text{m}$  の磁性体含有ポリスチレンラテックス (以下 Mg ラテックスとする。ローヌブーラン社) にウサギ抗 HBs 抗原  $F(ab')_2$  を感作した後、BSA で処理することにより粒子を安定化させた。

Eu 標識ラテックス 0.02%、Tb 標識ラテックス 0.2%、Mg ラテックス 0.2% の混合懸濁液を作製しラテックス試薬とした。

抗原として、遺伝子組換え法で産生された HBs 抗原をトリス緩衝液で希釈して 0、17.5、35、70、140、280 U/ml の標準液を作製した。

抗原溶液 60  $\mu\text{l}$ 、BSA 含有トリス緩衝液 460  $\mu\text{l}$ 、上記ラテックス試薬 80  $\mu\text{l}$  を加えた後、攪拌し、10 分間免疫反応を行わせた。

次に、磁石を用いて Mg ラテックス及び Mg ラテックスを含む反応凝集物を沈殿させ、上清サンプルとする。残りの沈殿は数回水で洗浄し、最後に 0.1% SDS 溶液に分散させ、沈殿サンプルとする。

日立蛍光分光光度系 F-4010 を用いて、

励起光 345nm、蛍光 616nm (Eu)

励起光 296nm、蛍光 546nm (Tb)

の蛍光を、上記上清、沈殿の両サンプルについて測定した。結果を表 1、図 1 に示した。

表 1

標準液 HBs 抗原 濃度 (U/ml)	蛍 光 強 度			
	上 清		沈 殿	
	Eu	Tb	Eu	Tb
0	139.9	55.49	4.652	3.686
17.5	134.5	51.00	9.437	4.486
35	129.0	59.24	12.83	4.829
70	116.3	51.81	17.49	4.311
140	97.14	49.38	28.39	4.233
280	71.95	49.98	42.85	4.087

抗原溶液中の抗原濃度が高くなるにつれて、Eu の蛍光強度は、上清サンプルでは小さく、沈殿サンプルでは大きくなることがわかる。それに対して、Tb の蛍光強度は、上記抗原溶液のような標準溶液では、非特異的な凝集を生じることは少なく、しかも常にほぼ一定した小さな値を示していることがわかる。

#### [実施例 2]

実施例 1 で用いたラテックス試薬 (Eu 標識、Tb 標識、Mg ラテックス混合懸濁液) を用いる。

試料溶液として、正常ヒト血清 (EIA 法にて HBs



抗原陰性が確認されているもの)、非特異検体(LPIA法にて非特異的凝集を示しEIA法にてHBs抗原陰性が確認されているもの)、HBs抗原陽性検体(ミドリ十字社HBs抗原。LPIA法にて陽性を確認した)を使用した。

実施例1と同様の反応、及び分離操作を行い、上清、沈殿の両サンプルを作製し、EuとTbの蛍光強度をそれぞれ測定した。結果を、表2、図2に示した。

表2

サンプル	蛍光強度			
	上 清		沈 殿	
	Eu	Tb	Eu	Tb
正常ヒト血清	1 143.0	41.91	6.106	4.364
	2 143.3	46.16	6.521	4.651
非特異検体	1 122.4	35.17	13.60	4.737
	2 142.5	51.35	8.575	5.404
	3 142.8	36.68	7.861	5.173
	4 138.2	50.63	9.947	5.399
	5 96.61	21.60	21.29	15.31
陽性検体	1 114.8	78.35	21.42	4.370
	2 130.4	60.03	9.466	4.358

はTbの測定値も非特異反応を示している。従って、Euの測定から陰性と判定された時はTbの測定値を併せて考慮することにより、真の陽性をより正確に判定できる。(表3参照)

表3

サンプル	上 清			沈 殿		
	Eu	Tb	判定	Eu	Tb	判定
正常ヒト血清	1 陰性	+	陰性	陰性	-	陰性
	2 陰性	-	陰性	陰性	-	陰性
非特異検体	1 陽性	+	保留	陽性	-	陽性
	2 陰性	-	陰性	陽性	+	保留
	3 陰性	+	陰性	陽性	+	保留
	4 陰性	-	陰性	陽性	+	保留
	5 陽性	+	保留	陽性	+	保留
陽性検体	1 陽性	-	陽性	陽性	-	陽性
	2 陽性	-	陽性	陽性	-	陽性

## [発明の効果]

本発明の方法によれば、高感度な免疫測定が可能だけでなく、粒子の非特異反応をも検出可能である。

HBs抗原のカットオフ値を10U/mlとすると、実施例1の結果から、Euの測定値が、上清では136.9以下、沈殿では7.404以上がHBs抗原陽性となる。また、非特異反応のモニターであるTbの測定値は、同様に実施例1の結果から、上清では45.0以下、沈殿では5.0以上が非特異反応が起こっていると考えられる。

従って、Euの測定値からHBs抗原陽性となった時は、Tbの測定値を考慮することにより、真の陽性であるか、判定を保留するかを判断する。判定保留の場合、通常は、確認用抗体で試料液中の抗原を吸収する操作により陽性であるかどうか判定することが行われる。

以上の判定を本実施例の各種検体にあてはめてみると、沈殿サンプルで、非特異検体のうちの1例でHBs抗原陽性と判定されてしまったが、残りの検体では、陽性検体の場合はEuの測定から抗原陽性、Tbの測定から非特異反応なしということがわかる。陰性検体の場合はEuの測定値が陰性を示すか、あるいはEuの測定値が陽性の領域に入った時

## 4. 図面の簡単な説明

図1は、HBs抗原濃度に対する蛍光強度の変化を示す図であり、図中、○は上清サンプルのEuキレート化合物の蛍光強度、●は沈殿サンプルのEuキレート化合物の蛍光強度、△は上清サンプルのTbキレート化合物の蛍光強度、▲は沈殿サンプルのTbキレート化合物の蛍光強度を示す。

図2は、試料溶液として正常ヒト血清、非特異(HBs抗原陰性)検体およびHBs抗原陽性検体を使用した、上清サンプルおよび沈殿サンプルの蛍光強度を示す図であり、○、●、△および▲は図1と同義を示す。

出願人 三菱化成株式会社

代理人 弁理士 長谷川 一

(ほか1名)

図 1

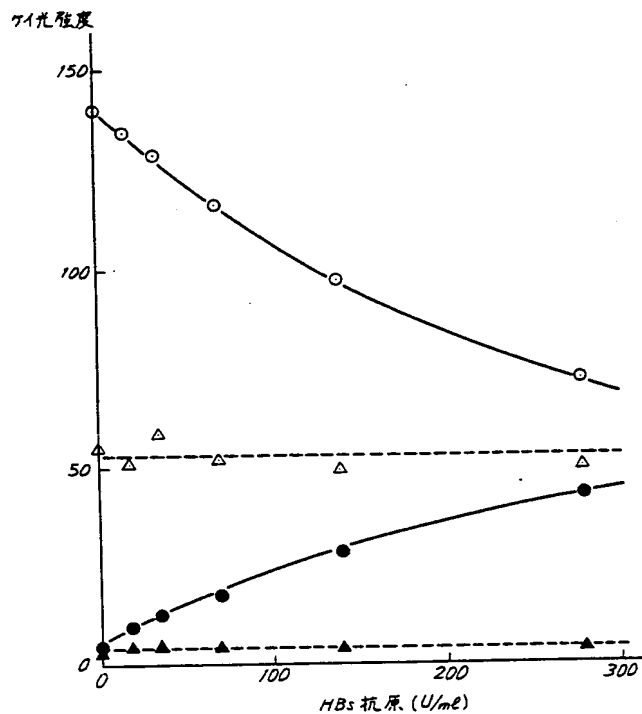


図 2

